

⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Patentschrift  
⑪ DE 2509783 C2

⑤ Int. Cl. 3:  
C07 C 103/52  
A 61 K 37/43

⑲ Aktenzeichen:  
⑳ Anmeldetag:  
㉑ Offenlegungstag:  
㉒ Veröffentlichungstag:

P 25 09 783.0-42  
8. 3. 75  
11. 9. 75  
17. 2. 83

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑮ Unionspriorität: ⑳ ㉑ ㉒  
08.03.74 JP P27442-74

⑰ Patentinhaber:  
Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka, JP

⑲ Vertreter:  
Schönwald, K., Dr.-Ing.; Fues, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;  
von Kreisler, A., Dipl.-Chem.; Keller, J., Dipl.-Chem.;  
Seltling, G., Dipl.-Ing., Pat.-Anw., 5000 Köln

⑳ Erfinder:  
Fujino, Masahiko, Takarazuka, Hyogo, JP; Fukuda,  
Tsunehiko, Suita, Osaka, JP; Shinagawa, Susumu, Higashi,  
Osaka, JP

㉑ Entgegenhaltungen:  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 1972, 698 bis 705;

⑮ Decapeptidamide und Verfahren zu deren Herstellung

## Patentansprüche:

## 1. Decapeptidamide der allgemeinen Formel

PyrGlu-His-Trp-Ser-R<sub>1</sub>-R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> 5  
 in der R<sub>1</sub> Tyr oder Phe, R<sub>2</sub> D-Nle, D-Nva, D-Abu, D-Phe, D-Ser, D-Thr oder D-Met und R<sub>3</sub> Leu, Ile oder Nle bedeuten.

2. Decapeptidamid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R<sub>1</sub> Tyr, R<sub>2</sub> D-Ser und R<sub>3</sub> Leu 10 bedeuten.

3. Decapeptidamid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R<sub>1</sub> Tyr, R<sub>2</sub> D-Phe und R<sub>3</sub> Leu bedeuten.

4. Verfahren zur Herstellung der Decapeptidamide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man in an sich bekannter Weise L-Pyroglutaminsäure oder ein der in Anspruch 1 angegebenen Aminosäuresequenz entsprechendes, N-terminal einen L-Pyroglutaminsäurerest aufweisendes Peptidfragment mit einer Aminokomponente, die dem restlichen Teil des gewünschten Decapeptidamids entspricht, kondensiert, wobei die beiden Reaktionspartner wahlweise eine oder mehrere Schutzgruppen enthalten können, und die gegebenenfalls vorhandenen Schutzgruppen abspaltet. 15

Die Erfindung betrifft neue Decapeptidamide mit starker ovulationsinduzierender Wirkung der allgemeinen Formel

PyrGlu-His-Trp-Ser-R<sub>1</sub>-R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> (I) 35

in der R<sub>1</sub> Tyr oder Phe, R<sub>2</sub> D-Nle, D-Nva, D-Abu, D-Phe, D-Ser, D-Thr oder D-Met und R<sub>3</sub> Leu, Ile oder Nle bedeuten.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung der Decapeptidamide der Formel (I). 40

In der Beschreibung und den Patentansprüchen sind Aminosäuren und Peptide und ihre aktivierten Carboxyl- oder Schutzgruppen mit Abkürzungen bezeichnet, wie sie entweder auf dem betreffenden Fachgebiet gebräuchlich sind oder vom Committee on Biochemical Nomenclature IUPAC-IUB vorgeschlagen wurden. Wenn nicht anders angeführt ist, weisen die Aminosäuren L-Konfiguration auf. 45

Folgende Abkürzungen wurden beispielsweise verwendet: 50

Abu:	$\alpha$ -Aminobuttersäure
Arg:	Arginin
BOC:	tert-Butoxycarbonyl
Bzl:	Benzyl
DCC:	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
Gly:	Glycin
His:	Histidin
HONB:	N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid
Ile:	Isoleucin
Leu:	Leucin
Nle:	Norleucin
Nva:	Norvalin
Met:	Methionin
OMe:	Methylester
OBzl:	Benzylester

ONB: N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximidester

OSu: N-Hydroxysuccinimidester

Phe: Phenylalanin

Pro: Prolin

PyrGlu: Pyroglutaminsäure

Ser: Serin

Thr: Threonin

Tos: Tosyl

Trp: Tryptophan

Tyr: Tyrosin

Es ist bekannt, daß der Hypothalamus Faktoren enthält, welche auf höherer Ebene die Sekretion topischer Hormone aus der Hypophyse regeln.

Nach der Isolierung eines Thyrotropin freisetzenden Hormons (TRH) wurde ein Hormon, das luteinisierende Hormone freisetzt (LH-RH), in reiner Form aus Schweinen und Schafen extrahiert und als ein Decapeptid der folgenden Struktur identifiziert: 20

PyrGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

[A. V. Schally et al, Biochem. Biophys. Res. Commun, 43, 1334 (1971); R. Guillemin et al, Proc. Nat. Acad. Sci, USA, 69, 278 (1972)]. Auf diese Erkenntnis folgte die Herstellung einer Anzahl ähnlicher Peptide. Mit den analogen Peptiden wurden auch biologische Tests durchgeführt. Da jedoch die physiologische Wirksamkeit des Peptids selbst durch geringfügige Modifikationen in der oben angeführten Aminosäurezusammensetzung stark beeinträchtigt wird, muß die oben angeführte chemische Struktur als wesentlich für die Erzielung der maximalen physiologischen Wirksamkeit angesehen werden [A. V. Schally et al, Biochem. Biophys. Res. Commun, 4, 366 (1972)]. 30

Kürzlich veröffentlichten Monahan et al. in »Biochemistry«, Band 12, Seiten 4616–4620 (1973), daß unter den von ihnen hergestellten LH-RH-Analogen wie z. B.

[Ala<sup>6</sup>]LH-RH, [D-Ala<sup>6</sup>]LH-RH,  
 [Val<sup>6</sup>]LH-RH, [D-Val<sup>6</sup>]LG-RH,  
 [Pro<sup>6</sup>]LH-RH und [D-Pro<sup>6</sup>]LH-RH

jene der Formel [D-Ala<sup>6</sup>]LH-RH die stärkste Wirksamkeit aufweist, nämlich 350–450% der Wirksamkeit der Stamm-LH-RH-Verbindung. Die Literatur lehrt weiterhin, daß LH-RH-Analoga, die in Stellung 6 eine D-Aminosäure mit einer größeren Anzahl von Seitenketten aufweisen, als D-Ala, weniger wirksam sind als das Stammhormon. Trotz des oben angeführten Standes der Technik ist es gelungen, Polypeptide der Formel (I), in welchen die D-Aminosäure in Stellung 6 eine größere Anzahl von Seitenketten aufweist als D-Ala, herzustellen und auf ihre LH-RH-Wirksamkeit zu testen. Dabei wurde überraschend gefunden, daß die erfindungsgemäßen Polypeptide der Formel (I) um wenigstens 1000% wirkungsvoller sind als ihre Stamm-LH-RH-Hormone. Die Erfindung beruht auf diesen Erkenntnissen. 55

Hauptziel der Erfindung ist daher die Bereitstellung von neuen Decapeptidamiden der Formel (I) und starker ovulationsinduzierender Wirksamkeit. 60

Ein weiteres Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung der Decapeptidamide der Formel (I).

Die Gegenstände der Erfindung gehen aus den Ansprüchen hervor. 65

Der Reaktant (A) ist daher L-Pyroglutaminsäure oder ein Peptidfragment, das eine N-endeständige L-Pyroglutaminsäure aufweist und außerdem von dort an die

Aminosäuresequenz der Formel (I) besitzt. Der mit dem Reaktanten (A) zu kondensierende Reaktant (B) ist eine Aminkomponente, welche dem Rest des Decapeptid-amidderivates der Formel (I) entspricht, wobei die

Reaktanten (A) und (B) gegebenenfalls geschützt sind. Grundlegende Kombinationsmöglichkeiten der Reaktanten (A) und (B) sind aus der nachstehenden Tabelle 1 ersichtlich.

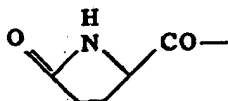
Tabelle 1

Kombination	Reaktant (A)	(B)
1	PyrGlu-OH	H-His-Trp-Ser-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> -Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>
2	PyrGlu-His-OH	H-Trp-Ser-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> -Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>
3	PyrGlu-His-Trp-OH	H-Ser-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> -Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>
4	PyrGlu-His-Trp-Ser-OH	H-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> -Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>
5	PyrGlu-His-Trp-Ser-R <sub>1</sub> -OH	H-R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> -Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>
6	PyrGlu-His-Trp-Ser-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> -OH	H-R <sub>3</sub> -Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>
7	PyrGlu-His-Trp-Ser-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> -OH	H-Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>
8	PyrGlu-His-Trp-Ser-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> -Arg-OH	H-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>
9	PyrGlu-His-Trp-Ser-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> -Arg-Pro-OH	H-Gly-NH <sub>2</sub>
10	PyrGlu-His-Trp-Ser-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> -Arg-Pro-Gly-OH	NH <sub>2</sub>

Es ist auch bekannt, daß eine geschützte L-Glutamylgruppe der allgemeinen Formel (II)



worin R<sub>4</sub> eine Alkoxygruppe wie z. B. Methoxy, Äthoxy, n-Propoxy, iso-Propoxy, n-Butoxy od. dgl., eine Arylalkoxygruppe wie z. B. Benzylalkoxy od. dgl., oder Amin bedeutet, leicht in die L-Pyroglutamylgruppe der Formel



durch in Kontaktbringen mit einer Base wie z. B. Ammoniak u. dgl. oder einer Säure wie z. B. Essigsäure od. dgl. umgewandelt werden kann und daß die Gruppe der Formel (II) in dieser Hinsicht der L-Pyroglutamylgruppe selbst äquivalent ist. Das erfindungsgemäße Verfahren ist auf der Annahme aufgebaut, daß das L-Pyroglutamyl (d. h. PyrGlu-) des Reaktanten (A) nicht nur die L-Pyroglutamylgruppe selbst, sondern auch die geschützte L-Glutamylgruppe der Formel (II) einschließt. Wenn das (Pyr)Glu- des Reaktanten (A) die Gruppe (II) darstellt, kann die Gruppe (II) leicht nach an sich bekannten Verfahren in die L-Pyroglutamylgruppe selbst umgewandelt werden.

Die erfindungsgemäße Kondensationsreaktion kann nach für die Herstellung von Peptidbindungen bekannten Verfahren durchgeführt werden. Beispiele für solche Kondensationsverfahren sind das DCC/HONB-Verfahren (BE-PS 7 96 399), das Azidverfahren, das Chloridverfahren, das Säureanhydridverfahren, das gemischte Säureanhydridverfahren, das DCC-Verfahren, das Aktivesterverfahren, das des Woodward-Reagens-K-Verfahrens, das Carbodiimidazolverfahren, das Oxidationsreduktionsverfahren und andere [vgl. The Peptides Band I (1966), Schröder und Lübke, Academic Press, New York].

Vor der Kondensation können die Carboxyl- und Aminogruppen, welche an der beabsichtigten Reaktion nicht teilnehmen sollen, geschützt werden oder die an der Reaktion teilnehmenden Carboxyl- und/oder Aminogruppen nach an sich bekannten Verfahren aktiviert werden. Die Carboxylgruppen in den Ausgangsstoffen können in Form von Metallsalzen (z. B. Natrium- und Kaliumsalzen) oder von Estern (wie z. B. Methyl, Äthyl, Benzyl, p-Nitrobenzyl, tert-Butyl- oder tert-Amylestern) geschützt werden.

Als Schutzgruppen für die Aminogruppen in den Ausgangsmaterialien sind alle bei der Herstellung der Peptide gebräuchlichen Schutzgruppen für Aminogruppen, wie z. B. die Benzylloxycarbonyl-, tert-Butoxycarbonyl-, Isobornyloxycarbonylgruppen geeignet. Die Iminogruppe des Histidins kann durch jede herkömmliche Schutzgruppe wie z. B. die Benzyl-, Tosyl-, 2,4-Dinitrophenol-, tert-Butoxycarbonyl- oder Carbobenzoxycarbonylgruppe geschützt werden. Die Hydroxylgruppe des Serins kann durch jede herkömmliche Schutzgruppe wie z. B. die Benzyl-, tert-Butylgruppe und andere ätherbildende Gruppen geschützt werden. Die Hydroxylgruppe des Tyrosins kann mit der Benzyl-, tert-Butyl- und anderen ätherbildenden Gruppen, die Guanidinogruppe des Arginins mit Gruppen wie z. B. die Nitro-, Tosyl-, Carbobenzoxycarbonyl-, Isobornyloxycarbonyl- oder Adamantylloxycarbonylgruppe geschützt werden. Als Beispiele für aktivierte Carboxylgruppen in den Ausgangsmaterialien seien das entsprechende Säureanhydrid, Azid oder aktive Ester [d. h. Ester mit Alkoholen wie z. B. Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol, 2,4-Dinitrophenol, Cyanomethylalkohol, p-Nitrophenol, N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid, N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxyphthalimid oder N-Hydroxybenzotriazol] genannt. Die aktivierten Aminogruppen in den Ausgangsmaterialien können z. B. das entsprechende Phosphorsäureamid sein.

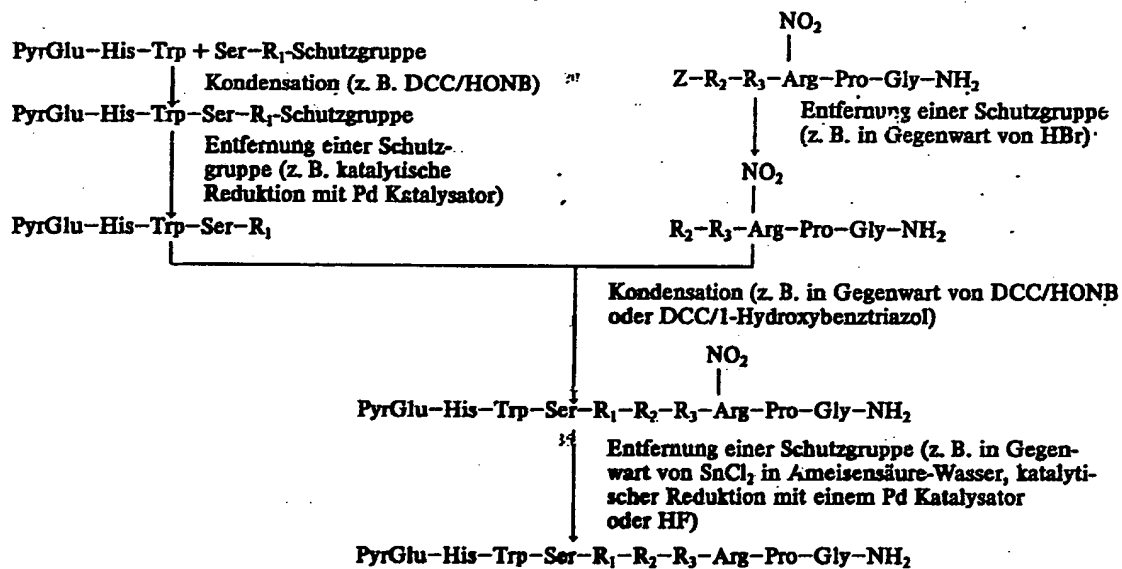
Aus der nachstehenden Tabelle sind Beispiele für Kombinationen solcher Formen von Carboxyl- und Aminogruppen in den Produkten (A) und (B) ersichtlich.

Tabelle 2

Beispiele für Kombinationen	Ausgangsmaterialien (A)		(B)	
	COOH	NH <sub>2</sub>	COOH	NH <sub>2</sub>
1*)	frei	geschützt	geschützt	frei
2	aktiviert	geschützt	frei	frei
3	frei	geschützt	geschützt	aktiviert

## Anmerkung:

In dem mit \*) bezeichneten Fall liegt im Reaktionssystem vorzugsweise ein Dehydratisierungsmittel wie z. B. ein Carbodiimid wie Dicyclohexylcarbodiimid vor. Eine Ausführungsform der Erfindung ist im nachstehenden Reaktionsschema dargestellt.



Diese Reaktion kann in Gegenwart eines Lösungsmittels durchgeführt werden. Das Lösungsmittel kann das gleiche sein wie es bei Peptidkondensationsreaktionen verwendet wird, z. B. können wasserfreies oder wässriges Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Pyridin, Chloroform, Dioxan, Dichlormethan, Tetrahydrofuran sowie geeignete Mischungen solcher Lösungsmittel als Beispiele angeführt werden.

Die Reaktionstemperatur liegt innerhalb eines Bereichs, welcher als für Reaktionen zur Peptidbindungsbildung geeignet bekannt ist, d. h. gewöhnlich innerhalb eines Bereichs von etwa -20 bis etwa 30°C. Die Precursorprodukte (die geschützten Peptide) der herzustellenden erfindungsgemäßen Verbindungen können leicht nach dem Festphasesyntheseverfahren hergestellt werden.

Nach Beendigung der Kondensationsreaktion können die gegebenenfalls vorhandenen Schutzgruppen nach bekannten Verfahren entfernt werden. Als Beispiele hierfür seien katalytische Reduktion in Gegenwart eines Katalysators wie Palladiumschwarz, Palladium auf Kohle, Platin, Solvolyse mittels Fluorwasserstoff, Trifluoressigsäure, und Reduktion mit metallischem Natrium in flüssigem Ammoniak genannt.

Das so hergestellte Peptid der Formel (I) kann aus dem Reaktionsgemisch nach an sich für die Gewinnung von Peptiden bekannten Verfahren wie z. B. Extraktion,

Verteilung, Säulenchromatographie gewonnen werden. Die erfindungsgemäße Reaktion kann nach jedem an sich bekannten herkömmlichen Festphasesyntheseverfahren durchgeführt werden.

Das Peptid der Formel (I) kann auch in Form eines Salzes gewonnen werden.

Als Säuren, die mit den Peptiden der Formel (I) Salze bilden, seien anorganische Säuren wie Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Perchlorsäure, Salpetersäure, Rhodanwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure und organische Säuren wie Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Glycolsäure, Milchsäure, Brenztraubensäure, Oxalsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Anthranilsäure, Zimtsäure, Naphthalinsulfonsäure oder Sulfanylsäure genannt.

Die erfindungsgemäßen Decapeptide der Formel (I) besitzen LH-RH-Wirkung (d. h., sie setzen ein luteinisierendes Hormon frei) und fördern daher die Sekretion von luteinisierendem Hormon (LH) und follikelstimulierendem Hormon (FSH). Die Polypeptide der Formel (I) sind daher für die Verwendung zur Förderung der Ovulation bei Frauen und Tieren wie z. B. Ratten, Schafen, Schweinen, Kühen, Stuten, Wachteln oder Hühnern geeignet, sie können auch für andere pharmazeutische Zwecke, für welche bisher herkömmliche LH-RH, LH und FSH-Präparate eingesetzt worden sind, verwendet werden.

Da die LH-RH-Wirkung der Decapeptide der Formel (I) etwa 10- bis 25mal stärker ist als die LH-RH-Wirkung der in der Natur vorkommenden Verbindungen, kann ihre Dosierungsmenge für jede Anwendung auf der Basis dieses Vielfachen ermittelt werden, wobei auch andere Faktoren (wie z. B. der Empfänger der Verabreichung oder die Art der Krankheit) in Betracht zu ziehen sind. So kann z. B. eine geeignete Dosierungsmenge innerhalb eines Bereiches von etwa 5 ng (Nanogramm) bis 10 µg täglich pro Kilogramm Körpergewicht liegen.

Decapeptide der Formel (I) werden vorwiegend nichtperoral, d. h. mittels Injektion, rektal oder vaginal verabreicht, obgleich sie in manchen Fällen auch peroral verabreicht werden.

Als Beispiele für geeignete Darreichungsformen seien Injektionen, Suppositorien, Pessarien und Pulver genannt. Die Injektionen können durch Lösen von etwa 10–500 γ eines Polypeptides der Formel (I) in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung hergestellt werden. Die Decapeptide der Formel (I) können auch durch Zugabe von Mannit als Excipienten in lyophilisierte Ampullenprodukte übergeführt werden und sind in dieser Form jederzeit als Injektionen gebrauchsfertig.

Die als Ausgangsmaterialien im erfindungsgemäßen Verfahren geeigneten Peptide können u. a. nach für die Peptidherstellung bekannten Verfahren hergestellt werden.

Die Erfindung wird anhand der Beispiele näher erläutert.

In den Beispielen bedeuten folgende Abkürzungen den Rf-Wert bei Dünnschichtchromatographie an Silikagel mit den folgenden Lösungsmittelsystemen:

Rf: Chloroform/Methanol/Essigsäure 9 : 1 : 0,5

RF: Äthylacetat/Pyridin/Essigsäure/  
Wasser 30 : 10 : 3 : 5

RF: n-Butanol/Äthylacetat/Essigsäure/  
Wasser 1 : 1 : 1 : 1

### Beispiel 1

Herstellung von PyrGlu-His-Trp-Ser-Phe-(D)-  
Nva-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

#### a) Herstellung von

Z-(D)-Nva-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

Einer Lösung von Z-(D)-Nva-OH (380 mg), H-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> (690 mg) und HONB (300 mg) in 5 ml Dimethylformamid werden 340 mg DCC bei 0°C unter Rühren zugegeben. Das Gemisch wird 2 Stunden lang bei 0°C und weitere 10 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird abfiltriert, um den entstandenen Dicyclohexylharnstoff zu entfernen, das Filtrat wird zur Trockne eingeeengt. Der erhaltene Rückstand wird in 100 ml Chloroform gelöst und die Lösung mit einer 4%igen wässrigen Natriumbicarbonatlösung und Wasser gewaschen. Die gewaschene Lösung wird über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird mit einem Gemisch aus Äthylacetat (25 ml) und Äther (25 ml) digeriert, man erhält ein weißes Pulver, das abfiltriert und aus Äthanol-Äther nochmals ausgefällt wird. Die Ausbeute beträgt 1,12 g, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -50,5° (c = 1,1 in Methanol), Rf = 0,32.

Analyse für C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>O<sub>9</sub>N<sub>10</sub>

berechnet C 53,32; H 7,27; N 19,43

gefunden C 53,49; H 7,56; N 19,19

#### b) Herstellung von PyrGlu-His-Trp-Ser-Phe-(D)- Nva-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

Z-(D)-Nva-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> (1,0 g) wird in 10 ml 25%igem Bromwasserstoff in Essigsäure gelöst und die Lösung 50 Minuten lang gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 200 ml trockenem Äther verdünnt, um einen Niederschlag zu erhalten, dieser wird abfiltriert und gut mit trockenem Äther gewaschen. Das gesammelte Pulver wird über Natriumhydroxid bei vermindertem Druck getrocknet. Dieses Pulver wird in 10 ml Dimethylformamid zusammen mit (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-OH (1,0 g) und HONB (440 mg) gelöst. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und unter Rühren mit 400 mg DCC versetzt. Das Gemisch wird 6 Stunden lang bei 0°C und weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird das Reaktionsgemisch filtriert, um den entstandenen Dicyclohexylharnstoff zu entfernen, das Filtrat wird unter Zugabe von 100 ml Äther digeriert, um einen Niederschlag zu erhalten, welcher abfiltriert wird. Der gesammelte Niederschlag wird in 10%igem wässrigem Äthanol gelöst und die Lösung über eine mit Polystyrolharz [Amberlite® XAD-2, 3,5 × 25 cm] gefüllte Kolonne geleitet. Die Kolonne wird nach dem Gradientenelutionsverfahren mit 10%igem wässrigem Äthanol und 100%igem Äthanol (500 : 550 ml) eluiert. Die Hauptfraktion (380–520 ml) wird gesammelt und zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird in 5 ml heißem Methanol gelöst und durch Zugabe von Äthylacetat nochmals ausgefällt, um das geschützte Decapeptidamid zu erhalten. 1,41 g [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -35,4° (c = 2,12 in Methanol), Rf = 0,20, RF = 0,56.

Das geschützte Decapeptidamid (500 mg) wird in 5 ml wasserfreiem Fluorwasserstoff zusammen mit 0,5 ml Anisol bei -70°C gelöst. Nach 30 Minuten langem Rühren bei -5°C wird der Fluorwasserstoff abgedampft. Der entstandene Rückstand wird in 20 ml Wasser gelöst und die Lösung zweimal mit 10 ml Äthylacetat extrahiert. Die wässrige Schicht wird über eine mit Carboxymethylcellulose (2 × 33 cm) gefüllte Kolonne geleitet, die Kolonne wird nach dem Gradientenelutionsverfahren unter Einsatz eines Ammoniumacetatpuffers als Eluens eluiert [0,005 M, pH 6,8 (500 ml) ... 0,2 M, pH 6,8 (500 ml)]. Die Hauptfraktion wird gesammelt (420–680 ml) und lyophilisiert, wobei ein weißes Pulver erhalten wird. Die Ausbeute beträgt 380 mg, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -32,4° (c = 0,52 in 5%iger Essigsäure), Rf = 0,05, RF = 0,68.

Aminosäureanalyse: His 1,01; Arg 0,98; Trp 0,87; Ser 0,94; Glu 1,00; Pro 1,02; Gly 1,00; Nva 1,01; Leu 1,00; Phe 0,97 (Peptidgehalt 84%).

### Beispiel 2

Herstellung von PyrGlu-His-Trp-Ser-Tyr-(D)-Nle-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> nach dem Festphaseverfahren

#### a) Herstellung von BOC-Gly-Harz

In 60 ml Chloroform-Äthanol (2 : 1) werden 10 g Chlormethylharz eingebracht (Cl-Gehalt 2,0 mmol/g), darauf folgt die Zugabe von 10,5 g BOC-Gly und 8,4 ml Triäthylamin. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur 1,5 Stunden gerührt und dann 24 Stunden lang erhitzt. Das Harz wird abfiltriert und gut mit Dimethylformamid, dann mit Äthanol, Wasser, Äthanol und Äther in angegebener Reihenfolge gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute beträgt 17,55 g. Die Aminosäureanalyse zeigt, daß dieses Harz 0,88 mmol/g BOC-Gly enthält.

b) Herstellung des PyrGlu-His(Tos)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-D-Nle-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-Harzes

In das Reaktionsgefäß einer automatischen Peptidherstellungsvorrichtung (Modell APS-800 von Simadzu Seisakusho K.K., Japan) werden 2,177 g BOC-Gly-Harz, das wie oben angeführt hergestellt wurde, eingebracht und mit Dichlormethan 12 Stunden lang angequollen. Dann werden folgende Aminosäuren nach dem unten angeführten Schema eingebracht:

BOC-Pro, BOC-Arg(Tos), BOC-Leu,  
BOC-D-Nle, BOC-Tyr(Bzl), BOC-Ser(Bzl),  
BOC-Trp, BOC-His(Tos), PyrGlu.

Dichlormethan (3 Minuten  $\times$  3),  $\rightarrow$  50% Trifluoressigsäure/Dichlormethan (10 bzw. 30 Minuten),  $\rightarrow$  Dichlormethan (3 Minuten  $\times$  3),  $\rightarrow$  Äthanol (3 Minuten  $\times$  3),  $\rightarrow$  Dichlormethan (3 Minuten  $\times$  3)  $\rightarrow$  10% Triäthylamin/Chloroform (10 Minuten)  $\rightarrow$  Chloroform (3 Minuten  $\times$  3)  $\rightarrow$  Dichlormethan (3 Minuten  $\times$  2)  $\rightarrow$  BOC-Aminosäureanhydrid (hergestellt aus BOC-Aminosäure und DCC nach einem bekannten Verfahren) (30 und 60 Minuten)  $\rightarrow$  Acetylierung (mit Säureanhydrid in Dichlormethan und Triäthylamin) (1 Stunde)  $\rightarrow$  Dichlormethan (3 Minuten  $\times$  3) [nur PyrGlu wird direkt mit DCC in Dimethylformamid kondensiert].

Das Harz wird mit Äthanol, Chloroform und Dimethylformamid, dann mit Äther gewaschen und getrocknet, die Ausbeute beträgt 6,20 g.

c) Herstellung von PyrGlu-His(Tos)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-D-Leu-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

In 50 ml mit Ammoniak gesättigtem Methanol werden 2,622 g des nach b) hergestellten Harzes suspendiert, die Suspension wird bei Raumtemperatur 70 Stunden lang gerührt.

Das Harz wird abfiltriert und mit Dimethylformamid gewaschen. Das Filtrat und die Waschwässer werden zusammengegeben, bei vermindertem Druck zur Trockne eingengt und mit Äther behandelt. Nach diesem Verfahren erhält man 1,187 g rohes Pulver.

588 mg dieses Produktes werden in einer trockenen Säule an 50 g Silikagel gereinigt, als Entwicklerflüssigkeit wird ein Lösungsmittelsystem aus Methanol und Chloroform verwendet. Man erhält 186 mg des gewünschten Produktes.

d) Herstellung von PyrGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

In Gegenwart von 0,2 ml Anisol und 0,2 ml Mercapto-  
10 äthanol werden 173,3 mg des nach c) hergestellten, geschützten Peptides in 5 ml trockenem Fluorwasserstoff gelöst, die Lösung wird bei 0°C 1 Stunde lang gerührt. Nach Ablauf dieses Zeitraumes wird sie bei vermindertem Druck zur Trockne eingengt und das Konzentrat in 20 ml Wasser gelöst. Die unlöslichen Stoffe werden abfiltriert und das Filter über eine Kolonne (1,5 cm Durchmesser  $\times$  20 cm) eines stark basischen Anionenaustauscherharzes (Amberlite® IRA-410 Acetat-Form) geleitet. Die vorgereinigten  
20 Effluente werden anschließend mittels Carboxymethylcellulose (1,5  $\times$  22 cm; nach dem Gradientenelutionsverfahren unter Einsatz von 0,005 M bis 0,2 M Ammoniumacetat mit einem pH-Wert von 6,8) und hierauf über Polystyrolharz (Amberlite® XAD-2) (1,5  $\times$  7,5 cm, nach dem Gradientenelutionsverfahren unter Verwendung von 5–70%igem wässrigem Äthanol) gereinigt. Das Eluat wird der Gelfiltrationschromatographie an Sephadex® LH-20 (0,9  $\times$  53,5 cm, 0,1 N Essigsäure) unterworfen. Man erhält 39 mg der gewünschten Verbindung.  
30  $[\alpha]_D^{25} - 40,5^\circ$  ( $c = 0,5$  in 5%iger wässriger Essigsäure).

Aminosäureanalyse (Säurehydrolyse in Gegenwart von Thioglycolsäure): Glu 0,97; His 0,97; Trp 0,94; Ser 0,88; Tyr 1,0; Leu 1,00; Nle 1,06; Arg 1,03; Pro 1,00; Gly 1,03 (87% Ausbeute).

Beispiele 3–13

In der nachstehenden Tabelle sind Decapeptidamide der Formel (I) angeführt, welche nach einem in Beispiel 2 angeführten ähnlichen Verfahren, jedoch unter Einsatz der in der Tabelle angegebenen Ausgangsmaterialien anstelle der in Beispiel 2 angeführten hergestellt wurden.

Tabelle

Bei- spiel	Decapeptidamide (I)			$[\alpha]_D^{25}$ (c = 0,5) in 5%iger wäßriger Essigsäure	Aminosäureanalyse	Ausgangsmaterialien, die anstelle der in Beispiel 2 angeführten eingesetzt wurden		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>			BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Nle	BOC-Leu
3	Tyr	D-Ser	Leu	-44.8°	His 1.02; Arg 1.01; Trp 0.97; Ser 1.91; Glu 1.00; Pro 1.01; Gly 1.03; Leu 0.97; Tyr 0.96	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Ser(Bzl)	BOC-Leu
4	Tyr	D-Abu	Leu	-43.2°	His 0.96; Arg 1.00; Trp 0.89; Ser 0.92; Glu 1.00; Pro 1.00; Gly 0.99; Abu 0.97; Leu 1.00; Tyr 0.98	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Abu	BOC-Leu
5	Tyr	D-Nva	Leu	-38.9°	His 1.00; Arg 0.99; Trp 0.92; Ser 0.91; Glu 1.00; Pro 1.00; Gly 1.01; Nva 0.97; Leu 0.98; Tyr 0.98	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Nva	BOC-Leu

## Fortsetzung

Bei- spiel	Decapeptidamide (I)			[α] <sub>D</sub> <sup>24</sup> (c = 0,5) in 5%iger wäßriger Essigsäure	Aminosäureanalyse	Ausgangsmaterialien, die anstelle der in Beispiel 2 angeführten eingesetzt wurden			
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>			BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Nle	BOC-Leu	
6	Tyr	D-Thr	Leu	-37.5°	His 1.01; Trp 0.95; Ser 0.92; Pro 1.00; Leu 1.00;	Arg 0.98; Thr 1.00; Glu 1.00; Gly 0.99; Tyr 0.98	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Thr	BOC-Leu
7	Tyr	D-Phe	Leu	-52.4°	His 1.00; Trp 0.87; Glu 1.00; Gly 1.01; Phe 1.00;	Arg 0.99; Ser 0.89; Pro 0.99; Leu 0.98; Tyr 0.96	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Phe	BOC-Leu
8	Tyr	D-Met	Leu	-42.0°	His 0.98; Trp 0.89; Glu 0.99; Gly 1.00; Leu 1.00;	Arg 1.00; Ser 0.92; Pro 0.98; Met 0.79; Tyr 1.00	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Met	BOC-Leu
9	Phe	D-Phe	Leu	-69.5°	His 1.00; Trp 0.87; Glu 1.01; Gly 1.00; Phe 1.98	Arg 0.98; Ser 0.98; Pro 0.98; Leu 1.00;	BOC-Phe	BOC-D-Phe	BOC-Leu
10	Tyr	D-Abu	Ile	-38.5°	His 1.00; Trp 0.92; Glu 1.03; Gly 1.00; Ile 0.98;	Arg 1.00; Ser 0.88; Pro 1.00; Abu 0.96; Tyr 0.98	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Abu	BOC-Ile
11	Phe	D-Ser	Nle	-32.5°	His 0.96; Trp 0.87; Glu 1.00; Gly 1.00; Phe 1.02	Arg 0.94; Ser 1.87; Pro 0.99; Nle 0.96;	BOC-Phe	BOC-D-Ser(Bzl)	BOC-Nle
12	Phe	D-Nle	Nle	-35.1°	His 1.00; Trp 0.82; Glu 1.02; Gly 1.00; Phe 0.97	Arg 1.01; Ser 0.89; Pro 1.00; Nle 2.03;	BOC-Phe	BOC-D-Nle	BOC-Nle
13	Phe	D-Nva	Ile	-35.5°	His 0.96; Trp 0.86; Glu 1.00; Gly 0.98; Ile 0.92;	Arg 1.00; Ser 0.89; Pro 1.00; Nva 0.90; Ile 0.99	BOC-Phe	BOC-D-Nva	BOC-Ile

Vergleich der ovulationsinduzierenden Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Decapeptidamide  $\text{PyrGlu-His-Trp-Ser-R}_1\text{-R}_2\text{-R}_3\text{-Arg-Pro-Gly-NH}_2$  mit LH/RH

Beispiel	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Ovulationsinduzierende Wirksamkeit ED <sub>50</sub> (ng/100 g b. w.)
Vergleich	Tyr	Gly	Leu	215 (LH/RH)
2	Tyr	D-Nle	Leu	9,8
3	Tyr	D-Ser	Leu	8,0
4	Tyr	D-Abu	Leu	8,6
5	Tyr	D-Nva	Leu	8,6
6	Tyr	D-Thr	Leu	9,9
7	Tyr	D-Phe	Leu	7,7

25 09 783

13

14

Fortsetzung

Beispiel	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Ovulationsinduzierende Wirksamkeit ED <sub>50</sub> (ng/100 g b. w.)
8	Tyr	D-Met	Leu	8,6
9	Phe	D-Phe	Leu	10,8
10	Tyr	D-Abu	Ile	12,7
11	Phe	D-Ser	Nle	12,0

Die ovulationsinduzierende Wirksamkeit wurde nach der in J. Med. Chem. 16, 1144 (1973) beschriebenen Methode bestimmt.



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

